

ÜBER DIE WIRKUNG VON WURZELEXTRAKTEN AUF EINZELLIGE ORGANISMEN

Von: FRANZ BICZÓK.

Institut für Zoologie und allgemeine Biologie der Universität Szeged, Ungarn.

In Verbindung mit früheren Untersuchungen hatte ich bereits darauf hingewiesen, dass in der Rhizosphäre der einzelnen Pflanzen — ähnlich wie die Zusammensetzung der Bakterien — auch die der Protozoen eine verschiedene ist (2, 3). Hiedurch wird die von mehreren Autoren betonte Ansicht, dass die Wurzeln eine spezifische Wirkung auf den Boden bzw. dessen Mikroorganismen ausüben (5), bekräftigt. Die Wurzelsäfte vermögen diese Wirkung nicht nur über ihre K-, Ca- und Mg-Verbindungen, Aminosäuren, Kohlehydrate, Phosphatide, Thiamin, Biotin, Mesoinosit und anderen Enzyme, sondern auch durch antibiotische Substanzen zu entfalten.

WINTER und Mitarbeiter (5) wiesen nach, dass der antibiotische Effekt auf Bakterien bereits durch Einlegen der Wurzelstückchen in Wasser zustandekommt. Auf eine derartige Wirkung der Wurzelextrakte hatte auch ich — aber in Verbindung mit den Protozoen — hingewiesen, als ich ihre räumliche Isolierung in den einzelnen Kulturen mit der Anwesenheit antibiotischer Stoffe in Zusammenhang zu bringen versuchte (3). Ich hegte aber auch den Gedanken, dass möglicherweise eine stimulierende oder hemmende Wirkung gegenüber den Protozoen von den Bakterien ausgehen könne. Die Entscheidung dieser Frage war einer der Gesichtspunkte, die mich bewegten, die Wirkung von Wurzelextrakten auf Bakterien und Protozoen unter vereinfachten Bedingungen zu untersuchen und ferner die Wechselwirkung von Bakterien und Protozoen in den als Nährboden benützten Wurzelextrakten zu studieren, ohne dabei aus dem Auge zu lassen, dass es sich bei den Versuchsergebnissen nicht um einen wahren Rhizosphäreneffekt handelt. Der zweite leitende Gesichtspunkt war, zu erforschen, welche morphologischen und physiologischen Veränderungen die Wurzelextrakte unmittelbar oder aber mittelbar — durch die Bakterien — in den verschiedenen Kulturen hervorrufen. KIDDLER (9) und Mitarbeiter beobachteten nämlich, dass *Tetrahymena vorax* in Kulturen verschiedener Nahrungszusammensetzung (Azotobakter cloacae-, abgetötete und lebende Tetrahymena gelei-, Hefe-, Gemüse- und Fleischextraktkulturen) Unterschiede in Grösse, Gestalt, Kondition und Aktivität erkennen liessen.

Untersuchungsmaterial und Methoden

Die zu den Versuchen benötigten Pflanzen wurden teils von der zwischen Pápa und Devecser gelegenen Pápakovácsér Wiese, teils von dem Überschwemmungsgebiet neben der Theiss von verschiedenen, ackerbaulich kultivierten und unkultivierten Gebieten eingeholt. Zwei auch pharmakologisch wichtige Arten wurden mir vom Pharmakognostischen Institut überlassen.

Von der Pápakovácsér Wiese stammten folgende Arten: *Achillea millefolium*, *Allium angulosum*, *Chichorium intybus*, *Colchicum autumnale*, *Daucus carota*, *Menta longifolia*, *Reseda lutea*, *Triticum aestivum*, *Verbena officinalis* und gemischte Wurzeln verschiedener Gräser.

Vom Überschwemmungsgebiet der Theiss wurden eingeholt: *Agrostemma githago*, *Aristolochia clematitis*, *Consolida orientalis*, *Euphorbia lucida*, *Lotus corniculatus*, *Mellilotus officinalis*, *Nonnea pulla*, *Oenothera biennis*, *Salvia nemorosa*, *Solanum dulcamare*.

Aus dem Pharmakognostischen Institut erhielt ich: *Datura stramonium* und *Ononis spinosa*.

Die erwähnten Pflanzen wurden im August, *Triticum aestivum* Ende Dezember 1954, gesammelt. Bei der Auswertung der Versuche muss in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Pflanzen fast zu gleicher Zeit gesammelt wurden und sich somit in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. Literaturangaben nach hängt nämlich die von der Rhizosphäre auf die Mikroorganismen ausgeübte Wirkung weitgehend davon ab, wieweit die Entwicklung der Pflanzen fortgeschritten ist (5, 6), da Quantität und Qualität der Wurzelwirkstoffe in den verschiedenen Entwicklungsgraden variieren kann.

Zu den Versuchen wurden dreierlei Kulturen benützt: 1. Kulturen, deren Nährlösung aus zerkleinerten, getrockneten Wurzelstückchen mit Wasser extrahiert worden war. Zwecks besserer Erhaltung der Wirksamkeit der chemischen Substanzen der Wurzeln wurden die Extraktionen auf dem Wasserbade bei 70–80° (40 Minuten lang) vorgenommen. Der so gewonnene Wurzelextrakt wurde dann am 11. IX. 1954 mit einer am 8. desselben Monats aus den Wurzeln verschiedener Kräuter der Pápakovácsér Wiese hergestellten Kultur beimpft. Zur Zeit der Überimpfung enthielt die Pápakovácsér Kultur zahlreiche Bakterien, neben den Ciliaten *Colpoda fastigata* wenige Flagellaten (hauptsächlich Bodo-Arten) und vereinzelt Cysten. Mit diesem Verfahren konnte ich die Alleinherrschaft der *C. fastigata* in fast allen Kulturen sichern, andere Protozoenarten erschienen nur vereinzelt und meistens nur in geringerer Zahl. So erachtete ich denn *C. fastigata* als Bioindikator für das Verhältnis der einzelnen Mikroorganismen in der Kultur zueinander.

2. Ende Dezember setzte ich eine Kultur mit dem Wurzelmaterial des kultivierten Weizenackers der Pápakovácsér Wiese (eingeholt am 27. Dez.) an, die in erster Linie als Vergleichsmaterial diente.

3. Gleichzeitig mit der vorhergehenden setzte ich eine Sonderkultur mit den Zwiebelknollen der im September gesammelten *Colchicum autumnale* von der Pápakovácsér Wiese an und beimpfte sie mit dem Heuinfusum der aus einem Abwasserkanal am rechten Ufer der Theiss eingeholten Probe mit Protozoen- und Bakterienmaterial und aus dem Material der Pápakovácsér Wiese mit *Pyxidium*-schwärmern. Die *Pyxidium*-schwärmer zeigten in dem Colchicinmedium auffallende physiologische Erscheinungen, weshalb ich aus dieser Kultur mehrere Überimpfungen in neue Colchicum-Zwiebelknollenextrakte und — zu Kontrolluntersuchungen — in reine wässrige Colchicinlösung vornahm. Von dem Protozoenmaterial der Pápakovácsér Wiese habe ich mehrere Überimpfungen vorgenommen. Diese Untersuchungen sind noch im Gange.

Der Protozoen- bzw. Bakteriengehalt der Kulturen wurde an Hand direkter Zählungen ermittelt. Bei der Protozoenzählung stellte ich die Zahl der in 0,5 ml Kulturflüssigkeit enthaltenen Tiere aus dem Quotienten Deckgläschengröße: Gesichtsfeld und die der Bakterien aus dem Quotienten Deckgläschengröße: 2 µ²-grosses Gesichtsfeld fest.

Pflanzenarten			Zeitpunkt der Untersuchung										
			12 IX.	15 IX.	16 IX.	20 IX.	23 IX.	28 IX.	2 X.	1. X.	19 X.	2 XI.	18 XI.
1	<i>Achillea millefolium</i>	B	16	9	8	6	5	4	4	2	2	3	2
		Cf	—	10500	6750	1800	1500	900	750	450	300	150	150
		E	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—
2	<i>Agrostemma githago</i>	B	10	8	8	3	3	3	4	4	3	2	2
		Cf	450	6000	5000	450	1200	900	450	3	3	—	—
		E	—	—	—	A	—	AR	NR	FNR	FNR	FNR	RN
3	<i>Allium angulosum</i>	B	14	13	7	6	8	7	5	7	3	4	2
		Cf	—	2000	900	750	1800	1800	900	900	300	150	300
		E	—	—	—	A	—	—	—	A	—	—	—
4	<i>Aristolochia clematitis</i>	B	11	15	11	9	8	7	8	6	6	5	3
		Cf	—	1500	2100	6000	2400	600	600	—	—	—	75
		E	—	—	ACF	F	—	—	—	—	—	—	—
5	<i>Consolida orientalis</i>	B	9	6	4	4	2	3	4	4	3	2	2
		Cf	—	1800	600	300	30	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	AC	AC	—	AC	AC	CNR	ACNR	CNR	CNR
6	<i>Datura stramonium</i>	B	10	6	4	4	4	3	4	4	5	4	1
		Cf	—	1500	1800	300	150	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	C	—	C	C	C	—	—	AC	C
7	<i>Cichorium intybus</i>	B	9	10	9	11	8	6	8	7	6	1	2
		Cf	—	1350	150	750	1350	300	900	5500	1500	15	—
		E	F	F	C	—	—	A	AF	AR	ACR	ACR	C
8	<i>Daucus carota</i>	B	10	8	10	3	3	4	7	4	4	4	2
		Cf	—	300	450	2300	1800	1500	2500	150	300	—	150
		E	C	—	C	C	—	—	AF	ACR	ACR	AR	AR
9	<i>Euphorbia lucida</i>	B	4	6	4	2	4	2	1	1	2	3	2
		Cf	—	2700	1200	150	750	150	—	—	—	—	—
		E	—	—	A	—	—	A	—	AR	R	R	R
10	<i>Lotus corniculatus</i>	B	6	8	12	6	9	5	3	6	4	2	2
		Cf	—	1200	450	—	150	300	75	750	150	—	15
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	<i>Mellilotus officinalis</i>	B	5	12	12	11	8	8	3	4	2	2	2
		Cf	—	2300	600	450	450	3700	1200	450	+6	150	3
		E	—	—	A	—	—	—	A	A	—	—	—
12	<i>Menta longifolia</i>	B	14	10	8	8	6	8	8	11	11	6	—
		Cf	—	600	300	300	150	300	15	2	3	600	—
		E	—	—	—	—	—	—	R	R	R	R	—
13	<i>Ononis spinosa</i>	B	4	4	7	2	4	2	1	1	1	1	1
		Cf	—	3000	1800	600	1000	450	5	1	—	3	3
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	<i>Nonnea pulla</i>	B	4	5	4	3	2	2	2	2	1	—	—
		Cf	150	450	450	750	450	750	300	1000	300	3	—
		E	—	—	AC	A	A	—	—	—	—	—	—
15	<i>Reseda lutea</i>	B	14	7	10	9	10	8	8	4	4	2	2
		Cf	—	—	—	—	—	—	2250	—	2000	450	300
		E	—	—	—	—	—	—	—	F	—	C	C
16	<i>Salvia nemorosa</i>	B	16	9	8	8	8	8	5	8	4	3	2
		Cf	—	13000	7500	1800	1350	900	300	600	3300	75	—
		E	F	F	—	A	—	—	—	F	F	F	F
17	<i>Solanum dulcamare</i>	B	13	9	9	9	7	7	1	4	4	4	—
		Cf	—	—	—	—	—	3750	750	150	1800	1200	—
		E	—	—	—	G	G	G	G	G	G	G	—
18	<i>Verbena officinalis</i>	B	7	10	7	9	8	6	7	10	7	4	2
		Cf	—	1800	900	1500	3750	150	5	—	—	—	—
		E	—	—	F	—	—	A	AR	AR	AR	R	R

Abkürzungen: A = Amöben, B = Bakterien, C = Ciliaten, Cf = *Colpode fastigiatum*, E = andere Protozoen, F = Flagellaten, G = mikroskopische Pilze, N = Nematoden, R = Rotatorien, + = Kultur mit Wasser auf gofrischt, ++ und +++ = Zeitpunkt der 2. und 3. Beimpfung, * = Eine Einheit bedeutet 1 Million Bakterien.

Untersuchungsergebnisse

1. QUANTITÄTSVERHÄLTNISSE VON PROTOZOEN UND BAKTERIEN

CUTLER, CRUMP und SANDON haben die zahlenmässigen Verhältnisse von Bakterien und Protozoen in humidem Ackerboden, TELEGDY—KOVÁCS in gedüngter Gartenerde (5) und VARGA (12) in Waldboden untersucht, meistens mit dem Ergebnis eines umgekehrten Verhältnisses zwischen Bodenbakterien- und Protozoenzahl. In Frischwurzelkulturen — insbesondere von *Graminae*-Arten — fand ich im Laufe meiner mehrjährigen Untersuchungen, dass ein ähnliches Verhältnis auch zwischen den Bakterien und Protozoen der Rhizosphäre besteht. In den mit *C. fastigata*-Individuen beimpften Wurzelextrakt-kulturen waren ähnliche Zusammenhänge zwischen den erwähnten Mikroorganismen nicht nachweisbar.

In den Wurzelextraktkulturen kam eine eigenartige Gestaltung der Mengenverhältnisse zwischen Bakterien und Protozoen zustande. Bereits in den ersten 24 Stunden setzte in der Mehrzahl der Kulturen eine maximale Bakterientätigkeit ein. Nach vorübergehenden Schwankungen nahm die Bakterienzahl zusehends ab und war nach Verlauf eines Monats in den meisten Kulturen um mehr als die Hälfte gesunken (Tabelle). Die Zahl der *C. fastigata* erfuhr — trotz der in einzelnen Kulturen erreichten ziemlich hohen Werte — eine der Bakterienzahl parallele Gestaltung. Die Colpoden erreichten einige Tage nach der Beimpfung ihre Höchstwerte und waren von da an fast drei Monate hindurch in schwankender, stetig abnehmender Zahl vorhanden. Das direkte Verhältnis zwischen Bakterien und Protozoen der nur eine Protozoenart enthaltenden Kulturen bedeutet einen Unterschied gegenüber den mehrere Arten beherbergenden Kulturen, wo eher ein indirektes Verhältnis besteht. Es machte sich aber auch noch ein anderer Unterschied zwischen den eine oder mehrere Protozoenarten enthaltenden Kulturen geltend.

Während in den Wurzelextraktkulturen mit nur einer Ciliatenart (*C. fastigata*) die Protozoen fast drei Monate hindurch zu beobachten waren, wurde in den über eine grössere Artenzahl von Protozoen verfügenden Wurzelkulturen ein schnelles Wechseln der Arten festgestellt (1).

In mehrere Protozoenarten enthaltenden Kulturen ist die Encystierung eine seltene Erscheinung. Nach meinen an einer grossen Anzahl von Kulturen gemachten Beobachtungen kommen in 0,5 ml Kulturflüssigkeit während der Vegetationsperiode durchschnittlich 50—300 Encystierungen vor. Nicht selten konnte ich eine Encystierung überhaupt nicht feststellen, obwohl die sich sonst gern einkapselnden Colpodaarten in grosser Zahl in den Kulturen vertreten waren. In den Wurzelextraktkulturen dagegen war die Encystierung der *Colpoda fastigata* während der Kulturzeit andauernd zu beobachten. Die Zahl der Cysten in 0,5 ml Kulturflüssigkeit stieg auf mehrere tausend, bei *Salvia nemorosa* erreichte sie sogar 90 000.

GAUS hat den Existenzkampf hinsichtlich der Nahrung in Gegenwart von Bakterien in dem Verhältnis von *Stylonichia mytilus* und *Paramaecium caudatum* zueinander studiert und festgestellt, dass diese beiden Arten einander hemmend beeinflussen. In diesem Wettstreit hat sich *S. mytilus* als stärker erwiesen (9). Die richtige Bewertung eines solchen Kampfes kann uns zweifellos

dem Verständnis näher bringen, weshalb in den mehrere Protozoenarten enthaltenden Kulturen innerhalb relativ kurzer Zeit ein Wechsel der verschiedenen Arten stattfindet. Das im folgenden Gesagte kann als Beitrag zu dieser Frage dienen, führt aber eine Lösung nicht herbei. Die Auslegung der erkannten Regelmässigkeiten erfordert weitere Studien und zwar um so mehr, als in den Wurzelextraktkulturen neben der Dominanz der *Colpoda fastigata* auch andere Arten von Protozoen erschienen. Von den Flagellaten kamen *Bodo*-Arten häufig, von den Amöben *Vahlkampfia limax*, *Dactylosphaerium radiosum*, *Amoeba vespertilio* in einigen Kulturen — zumeist vereinzelt —, von den Ciliaten *Cyclidium glaucoma* in einer Kultur zahlreich und *Chylodonella uncinata*, *Lionotus* sp., *Platyophrya vorax*, *Tachysoma pellationella* und *Vorticella microstoma* vereinzelt vor.

2. DIE WIRKUNG DER WURZELEXTRAKTE AUF DIE BAKTERIEN

Nach WINTER und Mitarbeitern sind in den Säften gewisser Wurzeln wirksame Antibiotika enthalten. An Hand der beigefügten Tabelle ist ein an eine gewisse Antibiotikumwirkung erinnernder Effekt auch auf Grund meiner eigenen Untersuchungen anzunehmen, da die Wurzelextrakte mancher Pflanzen die Mengenverhältnisse der Bakterien günstig, andere aber hemmend beeinflussen. So kamen in *Ononis spinosa*-, *Nonnea pulla*- und *Euphorbia lucida*-Wurzelextraktkulturen die Bakterien der Rhizosphäre der Pápakóvácser Wiese — im Vergleich zu den übrigen Kulturen — nur sehr mässig zur Vermehrung.

L. FERENCZI hat, meinem Wunsche nachkommend, Kontrolluntersuchungen mit den in den Versuchen benützten Wurzelarten durchgeführt und mit dem Bouillon-Agar-Diffusionsverfahren bei Anwesenheit der Gram-positiven Bodenbakterien *Bac. cereus* var. *mycoides* und *Bac. subtilis* und der Gram-negativen *Agrobacterium tumefaciens* und *Erwinia carotovora* gefunden, dass *Ononis spinosa* einen stark bakteriziden Effekt auf die Gram-positiven Arten ausübt. *Nonnea pulla* entfaltet gegenüber *Bac. cereus* var. *mycoides* einen stark- und gegenüber *Euphorbia lucida* einen schwächer hemmenden Effekt.

In der Mehrzahl der Wurzelextraktkulturen waren in den ersten Tagen, sofern ich auf Grund der morphologischen Verhältnisse der Bakterien feststellen konnte, Populationen aus verschiedenen Arten in annähernd gleicher Zusammensetzung aufgetreten. Die negativen Nigrosinfärbungen liessen erkennen, dass nach 1—2 Wochen eine wesentliche Vereinfachung der Populationszusammensetzung stattgefunden, d. h. die Artenzahl abgenommen hatte. In der 3. und 4. Woche kam in mehreren Kulturen nur eine oder höchstens zwei Arten zum Vorschein. Ausser der selektierenden Wirkung der Wurzelextrakte muss auch mit den sich durch die Wechselwirkungen der Bakterien bzw. das Vorhandensein ihrer Stoffwechselprodukte ergebenden Erscheinungen gerechnet werden.

3. DIE WIRKUNG VON WURZELEXTRAKTEN AUF DIE PROTOZOEN

Bei der Untersuchung der von den Wurzelextrakten in Gegenwart von Bakterien auf die Protozoen ausgeübten Wirkung kommen zwei Möglichkeiten in Frage: es kann eine direkte, oder aber eine indirekte, durch die Bakterien sich manifestierende Wirkung vorliegen.

Die direkte Wirkung der Wurzelextrakte auf die Protozoen untersuchte ich in den *Reseda lutea*-Kulturen. In der am 11. IX. angesetzten Kultur fand ich nach einer Woche nurmehr 1—2 Exemplare der eingepfropften *Colpoda fastigata*, die aber ebenfalls bald verschwanden. In den übrigen Kulturen dagegen erschienen bereits am 2. oder 3. Tage zahlreiche Ciliaten. Am 28. IX. übertrug ich die *Colpoda fastigata* der *Solanum dulcamare*-Kultur in die *Reseda*-Kultur. Schon am 4. Tage konnten mehr als 2000 wohlgenährte Tierchen gezählt werden, die aber nach zwei Wochen wieder verschwanden. Der *Reseda lutea*-Wurzelextrakt enthält demnach einen Faktor, welcher die Entwicklung der *Colpoden* hemmt. Dieser Hemmstoff ist in frischen Extrakten wirksamer als in alten Kulturen. Ein Kontroll-*Reseda*extrakt, der am 13. XII. mit *Colpoda fastigata* beimpft worden war, wies während zweier Wochen ebenfalls nur 1—2 Exemplare Ciliaten auf. Auch mehrere andere Kulturen hatten während der Untersuchungszeit ähnliche bakterielle Zusammensetzung wie die *Reseda*-kultur, doch waren die *Colpoden* ununterbrochen anwesend.

Neuere Untersuchungen mit in *Salvia nemorosa*-Wurzelextraktkulturen überimpften *Tachysoma pelliionella* begann ich am 5. I. 1955; binnen drei Tagen waren sämtliche Tiere eingegangen. Nach der am 8. I. vorgenommenen Neuimpfung mit derselben Art fand ich am nächsten Tage in 0,5 ml Kulturflüssigkeit 150 *Tachysoma*-Individuen. Zwei Wochen später waren die meisten Tiere encystiert, 0,5 ml Kulturflüssigkeit enthielt 750 Cysten. In den anderen *Salvia nemorosa*-Kulturen liess der Wurzelextrakt keinerlei Hemmungseffekt erkennen. Eine universale protozoentödende oder vermehrungshemmende Wirkung scheint demnach keiner der untersuchten Wurzelextrakte zu besitzen.

4. DIE WIRKUNG VON BAKTERIEN AUF DIE PROTOZOEN

Ein beträchtlicher Teil der Protozoen ist bezüglich seiner Nahrungsansprüche auf die Bakterien angewiesen, wie von mehreren Forschern angegeben wird. Nach ALEXEJEV leben *Cercomonas*-arten ausschliesslich von Kokken und kleinen Bakterien, und nach SERVERZOVA wird von vielen bodenbewohnenden Protozoen — gegenüber anderen Bakterien — *Azotobakter* bevorzugt. CUTLER und CRUMP stellten bezgl. der im Boden häufig vorkommenden *Colpidien* fest, dass sie nur im Beisein von *Sarcina lutea* gezüchtet werden können (5). Nach H. W. JOHNSON zeigen die Ciliaten eine Neigung zum Verschwinden, wenn ihr mit den Bakterien gebildetes Verhältnis nicht ausreichend ist (9).

Colpoda fastigata konnte, trotzdem Bakterienzusammensetzung und -menge in den 14 verschiedenen Wurzelextraktkulturen beträchtlichen Schwankungen unterworfen war, verhältnismässig gut gezüchtet werden. Diese Art kann somit hinsichtlich ihrer Nahrungsbedingungen nicht als anspruchsvoll bezeichnet werden.

Die Beobachtung JOHNSON's konnte durch folgende eigene Feststellung interessanterweise ergänzt werden, die ein fast klassisches Beispiel für die Zusammenhänge zwischen Bakterien und Protozoen zeigte. In einer Kultur der Ende Dezember von der Pápakóvácser Wiese eingeholten Weizenwurzelproben, die am 5. I. angesetzt worden war, erschienen am 9. I. auffallend viele Ciliaten: in 0,5 ml Kulturflüssigkeit zählte ich 2400 *Colpoda fastigata*, 1200 *C. cucullus*, 300 *C. steini*, 450 *C. sp.* und 300 *Pyxidium*-schwärmer, daneben ziemlich reich-

lich Flagellaten und rund 400—500 000 kurze Bacillen oder Mikrokokken. Am 12. I. waren sämtliche Protozoen — bis auf einige *Uronema* sp. — aus der Petrischale verschwunden. Die vorhergehenden Bakterien wurden durch lebhaft bewegliche Vibrien abgelöst. Diese Erscheinung ist nicht in dem Sinne zu erklären, dass die schnelle Veränderung durch das Verschwinden der die Nahrungsquelle der Ciliaten bildenden Bakterien bedingt gewesen wäre, waren doch gerade die *Colpoden* diejenigen Arten, die das Hungern auch in fast völlig bakterienfreien Kulturen tagelang aushielten und nebenbei auch den qualitativen Wechsel der Bakterien gut vertrugen. Nach dem Verschwinden der Bacillen und Mikrokokken hätten die Ciliaten noch mehrere Tage hindurch in den Kulturen anwesend sein müssen. *Der rapide Untergang der Ciliaten und der mit ihnen gleichzeitig anwesenden Bakterien ist zweifelsohne am annehmbarsten mit dem Erscheinen der hochvitalen Vibrien zu erklären.*

5. DIE PHYSIOLOGISCHE WIRKUNG DER WURZELEXTRAKTE AUF DIE PROTOZOEN

Für die verschiedenen Protozoen ist das Vorhandensein gewisser Bakterien und anderer spezieller Nährstoffe lebenswichtig. Es wurde z. B. nachgewiesen, dass *Euplotes taylori* nur in Reinkulturen bestimmter Bakterienarten in gewünschter Menge wächst. *Amoeba proteus* ist mit *Chlamidomonas*-kulturen gut ernährbar (4). Wie schon erwähnt, zeigte *Colpoda fastigata* keine so speziellen Nahrungsansprüche und war auch in Kulturen mit qualitativ variierendem Bakterienbestand gut zu züchten. Einige Wochen nach der Überimpfung der *Colpoden* aber wurde die Folge dessen, dass die Nahrung in den einzelnen Kulturen nicht gleichmässig und in stetem Abnehmen begriffen war, offenbar. In mehreren Kulturen zeigte sich eine wesentliche Verringerung der Körpergrösse der in Frage stehenden Tierchen; besonders augenfällig war diese in den *Mellilotus officinalis*-, *Achillea millefolium*- und *Menta longifolium*-Kulturen. In den *Reseda lutea*-Wurzelextrakten wurden Konstitution und Körpermasse (30—41 μ) der zum zweiten Male überimpften *Colpoden* alsbald verändert, nach drei Wochen stellten sie ebenfalls kleine Typen dar. Interessant ist, dass die *C. fastigata* der *Euphorbia lucida*-Kulturen gleich von Anfang an mager waren. Nach sechs Wochen verschwanden auch diese, zusammen mit der relativ kleinen Bakterienpopulation, aus den Kulturen; ein gut Teil davon hatte sich encystiert.

Aber nicht nur in ihren Körpermassen wiesen die *C. fastigata*-Exemplare Veränderungen auf, in zahlreichen Kulturen wurden auch *ihre charakteristischen Artmerkmale verwaschen*, da in den meisten mit *C. fastigata* beimpften Kulturen nach einem Monat eher die *C. inflata*-Formen erschienen. Es ist durchaus nicht davon die Rede, dass diese innerhalb so kurzer Zeit in Erscheinung getretenen, tiefgreifenden Umwandlungen durch die Veränderungen des umgebenden Mediums bedingt gewesen wären, eher dürfte es sich darum handeln, dass die *C. inflata* unter den über labile Merkmale verfügenden *Colpoden* nicht eine besondere Art, sondern eine oikologische Variante der *C. fastigata* darstellt.

Die in den Kulturen zutagegetretene Komplexwirkung hatte eine auffällige Veränderung auch in der Ernährungsphysiologie der Protozoen hervorgebracht,

für deren Beobachtung sich zwei sehr bezeichnende Beispiele boten. Das eine nahm ich in der am 11. IX. angesetzten *Daucus carota*-Wurzelextraktkultur an der *Amoeba vespertilio* wahr. Dieses Protozoon erschien am 2. X. zum ersten Male in der Kultur, seine Individuen verhielten sich zwei Wochen hindurch auffallend passiv. Mitte Oktober traten Rotatorien in geringerer Zahl auf. Inzwischen begannen die Amöben durch aktivere Ortsveränderungsbewegungen sich kleinere Cysten einzuverleiben. Am 2. IX. wurde ich bei mehreren Exemplaren eines eigenartigen Ernährungsmodus gewahr: wenn nämlich die Rotatorien während ihrer spannenden Bewegungen den *A. vespertilio* zunahe kamen, hafteten sie an ihnen fest und konnten nicht wieder loskommen. Ihr hinteres Körperteil war von einer Plasmahülle umgeben, in der sich sehr schnell eine Verdauungsvakuole bildete. Der Kauapparat des kontrahierten Tieres hörte binnen 8—10 Minuten zu funktionieren auf, das Opfer war vernichtet. Bald darauf war der ganze Organismus von Protoplasma umgeben. Diejenigen Rotatorien, die sich von den räuberischen Amöben freimachen konnten, gingen entweder zugrunde oder vollführten eine Zeitlang unsichere Bewegungen um ihre Körperachse und begannen erst allmählich wieder normale Spannbewegungen zu machen. Auf Grund des geschilderten Phänomens ist zu vermuten, dass *A. vespertilio* irgendeine giftige Substanz produziert, mit der sie ihr Opfer lähmt oder tötet. Diese Tätigkeit der räuberischen Amöben war mehrere Tage hindurch des öfteren zu beobachten.

Die andere ungewöhnliche Ernährungsart beobachtete ich in den *Cichorium intybus*-Wurzelextrakten im dritten Monate nach dem Ansetzen der Kultur (31. XII). Hier vernichtete bzw. einverleibte sich eine in die Familie der Amöbina Rhizopoda bistaiidae gehörende, unbekannte Art, eventuell *Naegleria* sp., einen *Lionotus*. Das schmale, gestreckte Tier von 21 μ Länge machte limaxartige, aber sehr langsame Bewegungen. Ein vorüberschwimmender *Lionotus* sp. kam mit dem Amöbenkörper in Berührung und blieb daran haften. Um das festhaftende Ciliatenvorderende entstand binnen 8 Sekunden eine Verdauungsvakuole von ansehnlicher Grösse, in der das Opfer alsbald verschwand. Der ganze Vorgang hatte etwa 15 Sekunden gedauert. Währenddessen hatte die Amöbe sich immer mehr verkürzt und regelrechte Flagellatengestalt angenommen, aber nur mit einer Geissel versehen. Während des Verdauungsvorganges machte das Tier lebhaft stossartige Bewegungen nach vorn und rückwärts und der *Lionotus* war in der grossen, einen beträchtlichen Teil des Protoplasmas einnehmenden Verdauungsvakuole — hufeisenförmig zusammengebogen — 20 Minuten lang gut sichtbar. Später wurde infolge der Einschnürung des Protoplasmas auch die Verdauungsvakuole mit ihrem Inhalt, dem einverleibten *Lionotus*, zweigeteilt. Während der Verdauung hatte sich auch noch eine dritte, kleinere Verdauungsvakuole gebildet; die terminal gelegene Pulsationsvakuole mit ihrer 10 Sekundenfrequenz war einwandfrei sichtbar. Eine Stunde nach der Einverleibung des Opfers wurde die Amöbe allmählich länger und die Geissel kürzer und nach beendeter Verdauung war der Flagellatencharakter schon nicht mehr erkennbar (Abb. 1).

Dass diese ungewöhnliche Ernährungsform zu Ende der Vegetationsperiode der Kultur erschien, wo die natürlichen Nahrungsquellen grossenteils versiegt waren, beweist, dass wir der zwingenden Wirkung der äusseren Umstände gegenüberstehen. Die in Rede stehenden Tiere flüchteten zu dieser Ernährungs-

weise, als die Aufrechterhaltung des Lebens anderen Wegen schon nicht mehr zu lösen war. Im Falle der *Amoeba vespertilio* kann daran gedacht werden, dass die in der Umgebung noch in geringer Zahl anzutreffenden Bakterien zur Befriedung ihrer Nahrungsansprüche nicht geeignet waren und deshalb diese Tiere sich an die Einverleibung der Cysten machten (häufige Erscheinung), sich den Rotatorien zuwandten.

Zur Bekräftigung der bekanntgegebenen Resultate sind weitere Untersuchungen an in sterile Kulturen überimpften, definierten Mikroorganismen geplant.

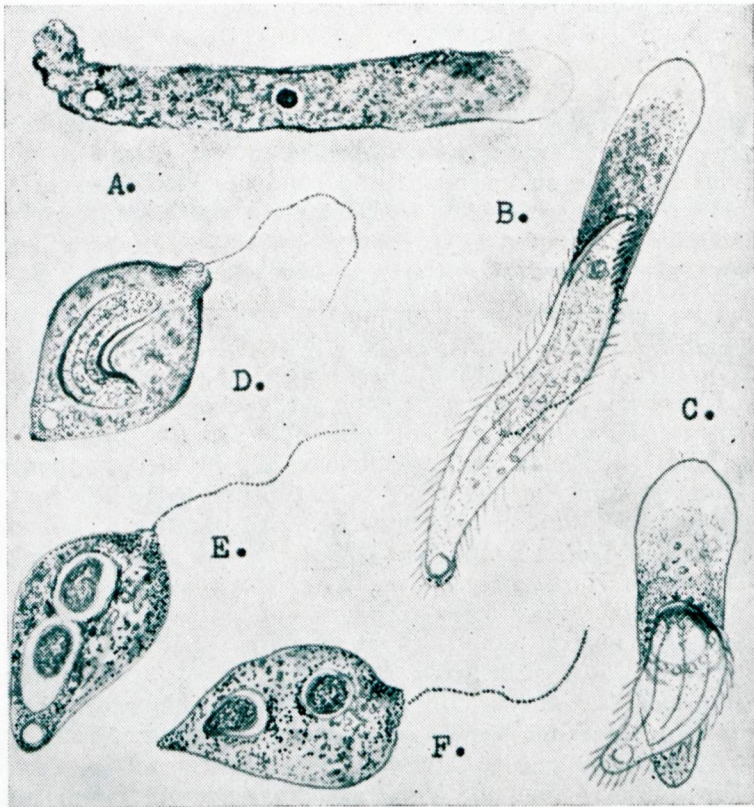


Abb. 1.: *Naegleria* sp. sich einen *Lionotus* einverleibend. A = Amöbenform, B—C = Ergreifen und Einverleibung der Beute. D—F = Flagellatenform, Verdauungsvorgang.

6. DIE WIRKUNG VON COLCHICUM AUTUMNALE-ZWIEBELKNOLLEN-EXTRAKT AUF DIE PROTOZOEN

Wie allgemein bekannt, enthalten die Blätter, aber auch andere Bestandteile von *Colchicum autumnale*, einen karyoklastischen Wirkstoff, das sog. Colchicin, welches die Zellkernteilung dadurch beeinflusst, dass es die Mitosen in der Metaphase zum Stillstand bringt. In Gewebskulturen wird er zur Hemmung der Geschwulstzellenteilung herangezogen (11). Im weiteren Verlaufe meiner Untersuchungen hatte ich auch Kulturen mit wässerigen Extrakten aus getrockneten *Colchicum autumnale*-Zwiebelknollen bereitet. Die Knollen enthalten 0,03—0,06% Colchicin (10). Ein Vergleich der in den reinen Colchicinkulturen und den Kulturen aus Zwiebelknollenextrakt vor sich gehenden Vermehrungserscheinungen ergab, dass das Colchicin der Zwiebelknollen für den Vorgang nicht indifferent ist. Da diese Untersuchungen noch im Gange sind, werden hier nur Teilergebnisse erörtert.

Von den in *Colchicum autumnale*-Zwiebelknollenextraktkulturen überimpften Arten, nämlich *Paramaecium caudatum*, *Chilodonella uncinata*, *Oxytricha* sp., *Pyxidium*-schwärmer, *Tetrahymena pyriformis* und *Polytoma papillatum* waren zwei Tage später nur noch die drei letzteren am Leben. Alle sechs Formen, insbesondere *T. pyriformis*, liessen eine schnelle Vermehrung erkennen: in 0,5 ml Kultur war die Individuenzahl von 1—2 am ersten Tage binnen wenigen Tagen in der gleichen Kulturmenge auf 35 000 gestiegen. *Pyxidium*-schwärmer und *T. pyriformis* konnten im weiteren Verlauf gemeinsam nebeneinander gut gezüchtet werden.

Die gewöhnliche Vermehrungsform, die Teilungen, waren bei *T. pyriformis* häufig und bei den *Pyxidien*-Schwärmern selten. Häufig waren auch Konjugationen; Konjugationspaare konnte ich auch bei den Schwärmern — aber insgesamt nur vier mal — beobachten.

Eine ausnahmsweise vorkommende, bei Schwärmern ungewohnte Vermehrungsform ist folgende: Die Tiere hatten sich zu Ende des individuellen Lebens am Grunde der Petrischale niedergelassen und verhielten sich mehrere Tage hindurch ruhig. Die Umwandlung in die auf einem kurzen Stiel sitzende Form begann damit, dass im Protoplasma meist ein kleiner »Embryo« entstand. Hatten die »Embryonen« $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{4}$ der Grösse des Muttertieres erreicht, so verliessen sie dieses und wuchsen zu einer entwickelten Lebensform mit etwa körperlangem Stiel heran. Da in diesem Vorgang manchmal auch intrazelluläre Teilungen vorkamen, diente diese Form der Metamorphose auch der Fortpflanzung. Bei den auf einem Stiel sitzenden Formen konnte ich keinerlei Vermehrungsvorgänge beobachten (Abb. 2 und 3).

Einen interessanten Vermehrungsmodus konnte ich bei *Amoeba proteus* studieren, welche ich aus der gemischten Wurzelkultur der Pápakovácsér Wiese in eine wässrige Colchicinlösung überimpft hatte. Die Aktivität der Bewegungen war bei diesen Tieren für einige Tage stark reduziert, es kam eine gestaltlose Plasmamasse und dann langsam eine ganz flach ausgebreitete Form zustande, erstere von 40—60, letztere von 290—420 μ Grösse. Neben der starken Plasmaströmung war die Entstehung zahlreicher feiner Granula auffallend, welche in schneller Aufeinanderfolge aus dem Protoplasma hervorgestossen

wurden. Zuweilen lösten sich gleichzeitig mit den Granula auch kleinere, etwa 3—4 μ grosse, tropfenförmige Plasmaportionen los. Diese Prozedur dauerte mehr als eine Woche lang, bis schliesslich das ganze Tier in kleine Stückchen zerfallen war. Die losgelösten Protoplasmaportionen entfernten sich mit Limax-artigen, amöboiden Bewegungen auf kleinere oder grössere Strecken vom

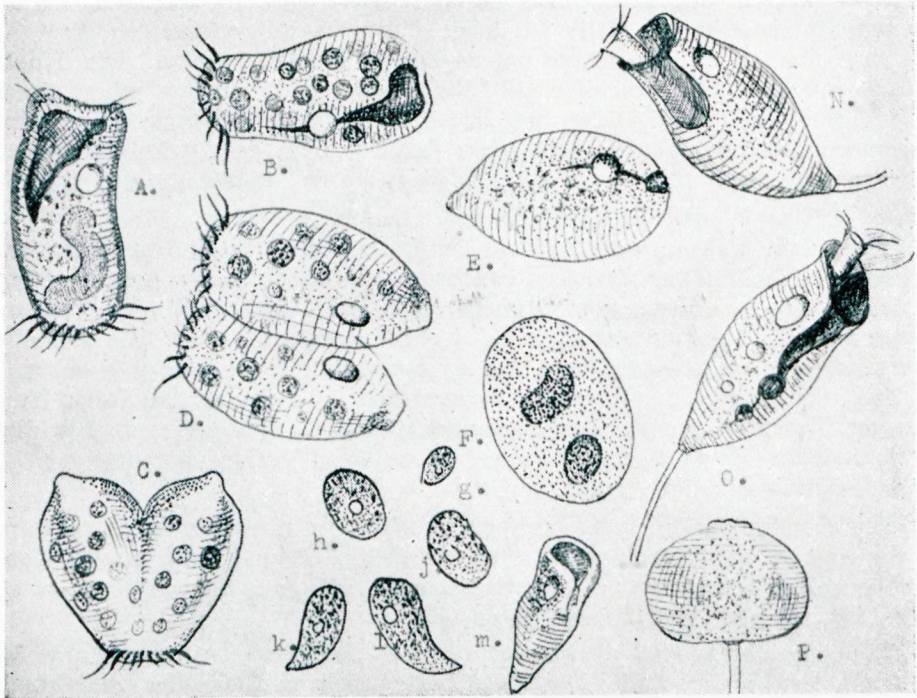


Abb. 2.: Entwicklungsstadien des Pyxidiumschwärmers. A—B = Schwärmer, C = Teilung, D = Konjugation, E = Ruhezustand, F = »Embryo«-Bildung, G—M = Umwandlung der »Embryonen« in sessile Formen, N—P = sessile Formen.

Mutterkörper, die meisten von ihnen blieben in Gestalt kleiner runder Scheibchen unbeweglich. Nach einigen Tagen begannen einige davon sich zu Amöben umzuwandeln. Der Kern war bei dem flach ausgebreiteten Muttertier nicht zu erkennen, wahrscheinlich war er zerfallen und von den abtretenden Plasmastückchen hatte jedes ein Fragment davon mit sich genommen (Abb. 3).

WOLSKA hat aus dem Protoplasma der *Amoeba proteus* kleine Amöben in die Kulturflüssigkeit wandern gesehen (13). Diese Erscheinung weicht in mancher Beziehung von der in den Colchicininlösungen beobachteten ab, unterscheidet sich aber nicht so stark von ihr, als dass ich auf Grund dessen den in seiner Zusammenfassung enthaltenen Hinweis, es handele sich bei den austretenden kleinen Amöben um fakultative Parasiten des Protoplasmas, unterstützen

könnte. Wir stehen hier einer äusserst seltenen Form der Vermehrung gegenüber, die — wie es scheint — mit Colchicin bis zu einem gewissen Grade nachgeahmt werden kann.



Abb. 3.: *Amoeba proteus* in der Colchicininlösung. A = ausgebreitete Form mit den sich loslösenden und schon losgelösten Plasmateilchen (a—b). B = Massenhafte Lösung von Plasmaportionen. C = zerfallener Plasmarest.

Zusammenfassung

Verfasser hat in einer Reihe von Versuchen die Wirkung wässriger Wurzelextrakte verschiedener Pflanzenarten auf Bakterien und Protozoen untersucht und die Gestaltung ihres Zahlenverhältnisses, sowie die Morphologie und Physiologie der Protozoen in den Wurzelextrakten studiert. Es wurde auch die von den Bakterien auf die Protozoen ausgeübte Wirkung untersucht, wobei folgende Ergebnisse resultierten:

1. In wurzelextrakthaltigen Bakterien-Protozoenkulturen hat bei vereinfachten Verhältnissen — wenn den Bakterien eine einzige Protozoenart (*Colpoda fastigata*) konkurrenzlos gegenübersteht — das im Boden (auch in der Rhizosphäre) mehrfach beobachtete Phänomen, dass Bakterien und Protozoen zahlenmässig in umgekehrtem Verhältnis zueinanderstehen, keine Gültigkeit. In solchen Kulturen besteht eine Proportionalität der zahlenmässigen Bakterien- und Protozoendaten.

2. In den mehrere Arten enthaltenden Kulturen findet ein schneller Wechsel der einzelnen Arten statt. In Wurzelextraktkulturen, in denen *Colpoda fastigata* konkurrenzlos lebte, blieb die dominierende Art, wenn auch in abnehmender Menge, solange erhalten, als auch Bakterien anwesend waren.

3. In den Kulturen mit mehreren Protozoenarten ist die Encystierung eine sporadische Erscheinung. In konkurrenzlosen Wurzelextraktkulturen kamen zahlreiche Encystierungen der *Colpoda fastigata* vor. Hier ist die Zahl der entstandenen Cysten der der aktiven Protozoen umgekehrt proportional.

4. Die Wurzelextrakte von *Ononis spinosa*, *Nonnea pulla* und *Euphorbia lucida* üben einen Hemmungseffekt auf die Bakterien aus. In den Wurzelextrakten dieser Arten zeigten auch die maximalen Bakterienzahlen nur auffallend niedrige Werte (s. Tabelle).

5. Einige der Wurzelextrakte haben auch auf die Protozoen einen hemmenden Einfluss.

6. Qualität und Quantität der in den Wurzelextrakten oder in aus ihnen hergestellten Kulturen lebenden Bakterien können von wichtigem morphologischem und physiologischem Einfluss auf die in der Kultur lebenden Protozoen sein. Die charakteristischen Artmerkmale der *Colpoda fastigata* wurden nach der Erschöpfung der Nahrungsquellen verwaschen und ihre Individuen erwiesen sich eher als *C. inflatae*.

7. Die qualitativen und quantitativen Nahrungsverhältnisse übten einen wichtigen Einfluss auf die Physiologie der Ernährung aus. *Amoeba vespertilio* vermag sich sogar Rotatorien einzuverleiben, wenn die erwünschte Nahrung nicht zur Verfügung steht. Eine *Naegleria*-Art (?) vertilgte, nachdem der Nahrungsbestand erschöpft war, einen *Lionotus* (Abbildung 1).

8. *Tetrahymena pyriformis* und *Pyxidium*-schwärmer gelangten in den Zwiebelknollenextrakten von *Colchicum autumnale* intensiv zur Vermehrung. Bei *Tetrahymena pyriformis* wurde Teilung und Konjugation, bei den Schwärmern Teilung und vereinzelt auch Konjugation beobachtet. Der bekannte zellvermehrungshemmende Effekt des Colchicins war also nicht zu beobachten.

9. Bei den *Pyxidium*schwärmern entstanden — wahrscheinlich auf die Colchicinwirkung — intrazellulär kleine »Embryonen«, die sich nach ihrem Ausschlüpfen zu sessilen, kurzstieligen Lebensformen entwickelten (Abb. 2). In der rein wässerigen Colchicininlösung lösten sich vom Protoplasma der *Amoeba proteus* zeitweise kleine Plasmaportionen mit Kernfragmenten ab; dieser Vorgang dauerte solange, bis das ganze Tier vollkommen verbraucht war. Die abgelösten Teilchen gingen meist zugrunde, einige von ihnen wurden zu unentwickelten, kurzlebigen neuen Amöben umgestaltet (Abb. 3).

Literatur

1. *Biczók, F.*: Agrokémia és Talajtan, Budapest, 1953. (N. 1. 51. 2. Tab.)
2. *Biczók, F.*: Annales Biol. Univ. Szegediensis, Budapest, 1954.
3. *Biczók, F.*: Állattani Közlemények, Budapest, 1955.
4. *Bradly—Scheer*: Comparative Physiology, London, 1948.
5. *Fehér, D.*: Talajbiologia, Budapest. 1954.
6. *Fjodorov*: Mikrobiológia, Moskau, 1949.
7. *Doflein—Reichenow*: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena, 1949—1953.
8. *Grandori*: Studi sui Protozoi del terreno. Parma, 1937.
9. *Hall, R.*: Protozoology. New-York, 1953.
10. *Hager's* Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Berlin, 1949.
11. *Issekutz, B. sen.*: Gyógyszertan. Budapest, 1954.
12. *Varga, L.*: Die Protozoen des Waldbodens, 1933.
13. *Wolska, J.*: Ann. Univ. Maria Curie-Slod., Lublin, Polen, 24. V. 1949.